

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 6 月 30 日 (30.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/059538 A1

(51) 国際特許分類: G01N 27/62, 33/68, C12Q 1/37 (26) 国際公開の言語: 日本語

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/018923 (30) 優先権データ: 特願 2003-419921

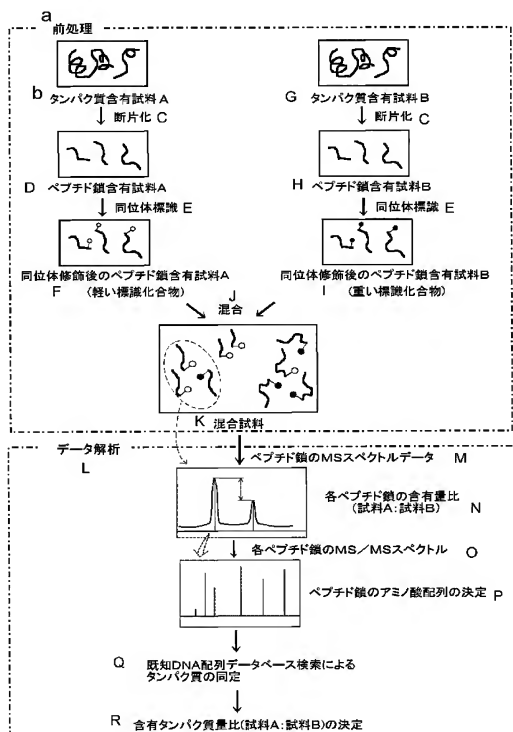
(22) 国際出願日: 2004 年 12 月 17 日 (17.12.2004) 2003 年 12 月 17 日 (17.12.2003) JP

(25) 国際出願の言語: 日本語

[続葉有]

(54) Title: PROTEIN ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: タンパク質解析方法



a... PRETREATMENT
b... PROTEIN-CONTAINING SAMPLE A
c... FRAGMENTATION
d... PEPTIDE CHAIN-CONTAINING SAMPLE A
e... LABELING WITH ISOTOPE
f... PEPTIDE CHAIN-CONTAINING SAMPLE A AFTER MODIFICATION WITH ISOTOPE (LIGHT LABELED COMPOUND)
g... PROTEIN-CONTAINING SAMPLE B
h... PEPTIDE CHAIN-CONTAINING SAMPLE B
i... PEPTIDE CHAIN-CONTAINING SAMPLE B AFTER MODIFICATION WITH ISOTOPE (HEAVY LABELED COMPOUND)
j... MIXING
k... MIXED SAMPLES
l... DATA ANALYSIS
m... MS SPECTRAL DATA OF PEPTIDE CHAINS
n... CONTENT RATIO OF PEPTIDE CHAINS (SAMPLE A: SAMPLE B)
o... MS/MS SPECTRA OF PEPTIDE CHAINS
p... DETERMINATION OF AMINO ACID SEQUENCES OF PEPTIDE CHAINS
q... IDENTIFICATION OF PROTEINS BY SEARCHING FOR DATABASE OF KNOWN DNA SEQUENCES
r... DETERMINATION OF MASS RATIO OF CONTAINED PROTEINS (SAMPLE A: SAMPLE B)

(57) Abstract: It is intended to provide a protein analysis method whereby proteins can be identified and the quantification data can be obtained by a convenient procedure. Namely, a protein analysis method characterized by comprising: the step of cleaving two protein-containing samples individually with restriction enzymes at specific amino acid sites to give peptide chain-containing samples; the step of modifying peptide chains contained in the peptide chain-containing samples with labeling compounds having different masses due to isotopes so as to impart different masses to the peptide chains; the step of mixing the isotope-labeled peptide chain-containing samples and fractionally quantifying the sample mixture for individual peptide chains so as to determine a content ratio; the step of selecting peptide chains to be subjected to amino acid sequence identification from the peptide chains and identifying the amino acid sequences of the peptide chains; the step of specifying proteins corresponding to the peptide chains; and the step of determining the content ratio of the thus specified proteins based on the fractional quantification data of the peptide chains.

(57) 要約: 本発明の目的はタンパク質の同定及びその定量情報をより簡単な処理で得ることのできるタンパク質解析方法を提供することにある。本発明のタンパク質解析方法は、2種のタンパク質含有試料をそれぞれ制限酵素により特定アミノ酸部位で切断し、ペプチド鎖含有試料とする工程と、同位体により異なる質量差を有する標識化合物をペプチド鎖含有試料に含まれるペプチド鎖に修飾し、ペプチド鎖に質量差を与える工程と、各同位体標識したペプチド鎖含有試料を混合し、該混合試料を各ペプチド鎖毎に分別定量して含有量比を求める工程と、各ペプチド鎖からアミノ酸配列を特定すべきペプチド鎖を選択し、該ペプチド鎖のアミノ酸配列を定性する工程と、ペプチド鎖に対応するタンパク質を特定する工程と、ペプチド鎖の分別定量値に基づいて、特定したタンパク質の含有量の比を求める工程と、を含むことを特徴とする。



WO 2005/059538 A1



(71) 出願人 および

(72) 発明者: 山内 芳雄 (YAMAUCHI, Yoshio) [JP/JP]; 〒1910052 東京都日野市東豊田 3-2-13 豊田第二コーポラス 403 Tokyo (JP). 新川 孝志 (ARAKAWA, Takashi) [JP/JP]; 〒1920372 東京都八王子市下柚木 12-88 Tokyo (JP). 磯辺 俊明 (ISOBE, Toshiaki) [JP/JP]; 〒1920916 東京都八王子市みなみ野 5-6-7 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 岩橋 祐司 (IWAHASHI, Yuji); 〒2210045 神奈川県横浜市神奈川区神奈川 2-18-16 Kanagawa (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,

SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

タンパク質解析方法

関連出願

- [0001] 本出願は、2003年12月17日付け出願の日本国特許出願2003-419921号の優先権を主張しており、ここに折り込まれるものである。

技術分野

- [0002] 本発明は、タンパク質の解析方法、特に質量分析計を用いた解析方法の改良に関する。

背景技術

- [0003] 近年のゲノムプロジェクトのような遺伝子情報の解析プロジェクトの進展に伴い明らかにされた膨大な遺伝子情報と、細胞内で複雑に相互作用している多様なタンパク質との関連を明らかにすることにより、遺伝子の機能解析が進められている。プロテオーム解析は、細胞の機能を支える多様なタンパク質の関係を総合的にとらえようとする試みである。しかし現在の分析技術ではタンパク質の解析には多大な時間と労力が必要であるため、このように多様性に富むタンパク質の集合であるプロテオームの変化を、総合的に、しかも迅速に把握する方法が求められている。

従来タンパク質の分離分析として一般的に行われている電気泳動法では、高い分離能で分離できる一方で、自動化が困難で再現性や定量性の確保が難しいという問題があった。

そこで、近年、液体クロマトグラフと質量分析計、データ解析システムを結合し、試料の分離からタンパク質の同定に至る過程を一貫して自動的に行う大規模なタンパク質同定システムが開発されている。

特許文献1:特開2003-107066号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0004] また、正常状態と疾病状態の間における、細胞タンパク質の量の変化や、発生中の組織、病気になった組織、または遺伝的に変異した組織で発現するタンパク質の量

を求める需要も高まっている。つまり、細胞内のタンパク質の同定だけでなく、タンパク質の量といった定量情報も同時に求められている。

そのため、ICATTM(登録商標)試薬を用いた試料間の定量比較が広く行われている(例えば、特許文献1参照)。しかし、このICATTM(登録商標)法では、前処理操作が煩雑であるという問題があった。

本発明は、上記課題に鑑みなされたものであり、その目的はタンパク質の同定及びその定量情報をより簡単な処理で得ることのできるタンパク質分析方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0005] 上記目的を達成するために、本発明のタンパク質解析方法は、質量分析計を用い、2種のタンパク質含有試料を対比して、それぞれの試料に含まれるタンパク質の同定及びそれぞれの試料に含まれる同種のタンパク質の量比を解析するタンパク質解析方法において、前記2種のタンパク質含有試料をそれぞれ制限酵素により特定アミノ酸部位で切断し、ペプチド鎖含有試料とする工程と、同位体により異なる質量差を有する標識化合物を前記それぞれのペプチド鎖含有試料に含まれるペプチド鎖に修飾し、それぞれのペプチド鎖含有試料に含まれる同種のペプチド鎖に質量差を与える工程と、各同位体標識したペプチド鎖含有試料を混合し、該混合試料を各ペプチド鎖毎に分別定量してMSスペクトルを測定し、同位体標識によって質量差を与えられた同種のペプチド鎖について含有量比を求める工程と、前記MSスペクトルを参照して、各ペプチド鎖からアミノ酸配列を特定すべきペプチド鎖を選択し、該ペプチド鎖から生成されるプロダクトイオンの質量スペクトルによって、該ペプチド鎖のアミノ酸配列を定性する工程と、前記ペプチド鎖のアミノ酸配列に基づき、既知DNA配列より対応するタンパク質を特定する工程と、前記同位体修飾したペプチド鎖の質量差による分別定量値に基づいて、前記特定したタンパク質の前記各タンパク質含有試料に含まれる含有量の比を求める工程と、を含むことを特徴とする。

[0006] 上記のタンパク質解析方法において、前記標識化合物としてO-メチルイソウレアとその安定同位体を用いることが好適である。

上記のタンパク質解析方法において、前記同種のペプチド鎖の含有量比を求める

工程で、前記修飾化合物によって質量差を与えられた同種のペプチド鎖の2つのMSスペクトルのピークを比較する際に、天然に存在する同位体元素によるペプチド鎖の同位体ピークとの重なりを除去して定量比の補正をすることが好適である。

発明の効果

- [0007] 本発明に係るタンパク質分析方法によれば、簡単な処理でタンパク質の定量情報を得ることが可能となる。

図面の簡単な説明

- [0008] [図1]本発明にかかる実施形態のタンパク質分析方法の説明図
[図2]データ処理の説明図

発明を実施するための最良の形態

- [0009] 以下に図面を参照して本発明の好適な実施形態を説明する。図1は、本実施形態のタンパク質解析方法の流れを示す説明図である。本実施形態のタンパク質解析方法は、タンデム型の質量分析計を用い、2種のタンパク質含有試料を対比して、それぞれの試料に含まれるタンパク質の同定及びそれぞれの試料に含まれる同種のタンパク質の量比を解析するというものである。

2種のタンパク質試料としては、例えば、同種の生体組織について、一つは健常状態のサンプルから採取したもの、もう一方は、疾病状態のサンプルから採取したもの等が想定される。そして、それらのタンパク質含有試料に含まれるタンパク質成分の発現量を定量比較する。

本実施形態のタンパク質解析方法の工程は、試料の前処理の工程(図1での混合試料を作成する段階まで)と、タンデム型質量分析計によって得たデータの解析の工程(図1でMSスペクトルによる含有量比の決定、MS/MSスペクトル及びデータベースによるタンパク質の同定の部分)とに大きく分けられる。

- [0010] 試料の前処理の工程では、比較する2種のタンパク質含有試料の処理を行う。ここでの主な目的は、それぞれの試料に対し、同位体によって異なる質量数を持った標識化合物を標識し、質量差によってどちらの試料に由来するタンパク質であるか標識付けることにある。また、質量分析計によってタンパク質の1次構造を決定するためには、タンパク質成分をより短いペプチド鎖に切断する必要がある。

そこでまず初めに、2種のタンパク質含有試料(図1ではそれぞれ試料A、試料Bとした)について、試料中のタンパク質成分を制限酵素によって特定の amino 酸部位で切断してペプチド鎖とし、元の試料からペプチド鎖含有試料A、Bを得る。ここで、ペプチド鎖とは amino 酸の個数が数個から十数個のものを指す事とする。つまり、質量分析計によって分析可能な長さのものを指す。

[0011] 次にそれぞれのペプチド鎖含有試料に、質量差を有する標識化合物を修飾する。この標識化合物として、それを構成する元素の一部を同位体元素に変えることで質量数の異なる2つのものを用意する。図1では、ペプチド鎖含有試料Aに対し、軽い標識化合物、同じく試料Bに対し、重い標識化合物を修飾した場合を示している。

このようにして同位体標識したそれぞれのペプチド鎖含有試料を混合する。

[0012] 次にこうして得た混合試料を、液体クロマトグラフ及びタンデム型質量分析計によって分析を行う。本実施形態では、まず液体クロマトグラフによって、各ペプチド鎖毎に分離する。

そして、各ペプチド鎖は、タンデム型質量分析計へと送られ、第1の質量分析計でMSスペクトル、第2の質量分析計でMS/MSスペクトルが得られる。こうして得られたデータの解析は以下のようにして行う。

各ペプチド鎖は、試料A由来のものと、試料B由来のものがあり、同位体標識によって一定の質量差が与えられている。そのため、上記のMSスペクトルデータでは、試料A由来のペプチド鎖のピークと、試料B由来のペプチド鎖のピークが分離して示される。これらの各ピーク高さ(または、ピーク面積等)を比較することで、このペプチド鎖の試料Aでの含有量と試料Bでの含有量との比を求めることができる。

[0013] 次に上記のペプチド鎖が何のタンパク質の一部であったかを特定するため、上記各ペプチド鎖のMS/MSスペクトルデータを解析する。このとき、上記MSスペクトルを参照して、測定した各ペプチド鎖の内、どのペプチド鎖についてタンパク質の特定を行うかを選択することができる。

選択されたペプチド鎖に対して、周知の解析技術によって、MS/MSスペクトルデータから各ペプチド鎖の amino 酸配列を決定することができる。つまり、ペプチド鎖の amino 酸配列に基づき、既知DNA配列を記憶した公知のデータベースによって、そ

のペプチド鎖に対応する遺伝子及びタンパク質を特定することができる。

上記でペプチド鎖の試料Aでの含有量と試料Bでの含有量との比は求められていたので、そのペプチド鎖に対応したタンパク質について、試料Aでの含有量と試料Bでの含有量との比が求められることとなる。

[0014] 以上が本実施形態の概略説明である。以下に、各工程について詳細に説明する。

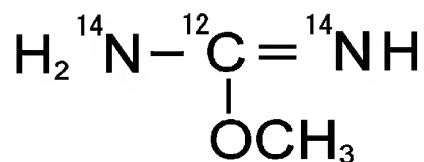
まず、最初の工程では、2種類のタンパク質含有試料A、Bに対し、それぞれの試料を制限酵素によって特定のアミノ酸の部位で切断し、ペプチド鎖に断片化する。この制限酵素としては、Lys-C/Pを用い、リジンのC末端側で切断すればよい。

次の工程では、上記のようにペプチドに断片化した試料に対し、質量差を有する標識化合物を修飾することで、試料A、試料Bにそれぞれ含まれるペプチド鎖に質量差を与える。

標識化合物として下記の化学式(1)、(2)で表されるO-メチルルーイソウレア(O-methyl-isourea)を用いる。

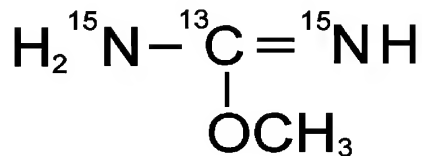
[0015] 化学式(1)

[化1]



化学式(2)

[化2]

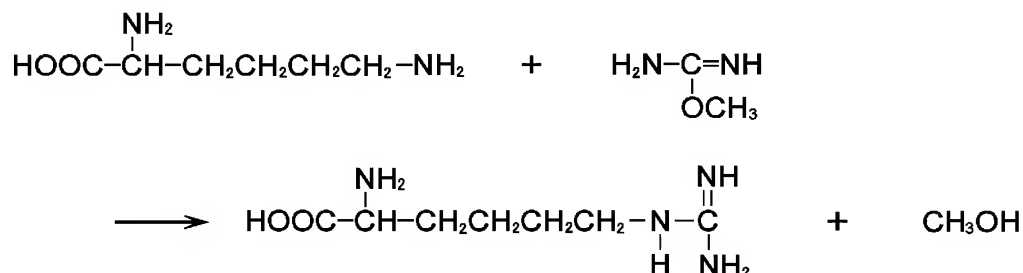


ここで、上記の化学式でC及びNの左肩の数字は、質量数を表している。つまり、重い標識化合物(化学式(2))は、軽い標識化合物(化学式(1))の質量数14の窒素原子

N及びメチル基以外の質量数12の炭素原子Cを、それぞれ、質量数15の窒素原子N、質量数14の炭素原子Cという安定同位体置き換えている。そのため、重い標識化合物(質量数45)と軽い標識化合物(質量数42)とでは3Daの質量差を持つことになる。

上記のO-メチルイソウレアは下記の反応でリジン残基の部分と結合する。

[0016] [化3]



そこで、軽い試薬で試料Aに含まれるペプチド鎖を、重い試薬で試料Bに含まれるペプチド鎖を、それぞれ同位体修飾する。その後、これらの同位体標識をした試料A、試料Bを混合する。

次に上記の混合試料を液体クロマトグラフ(LC)によって分離する。重い標識化合物と軽い標識化合物とには化学的性質には相違はない、つまり同種のペプチド鎖であれば試料A由来のものと試料B由来のものとは、質量数以外の部分には差がないため、LCによる分離では、同種の試料A由来のペプチド鎖と試料B由来のペプチド鎖とは同一のピークとして現れる。混合試料は、LCによる分離の後、質量分析計によって分析が行われる。

[0017] 本実施形態においては質量分析計として、四重極飛行時間型のタンデム型質量分析計(MS/MS)を用い、MSスペクトル及びMS/MSスペクトルを測定する。この装置構成としては、従来と同様なものを用いることができる。また、この他にもフーリエ変換質量分析計(FT-MS)も用いることが可能である。LCによって分離された混合試料は、ESI(エレクトロスプレーイオン化法)等で、ペプチド鎖がイオン化され、第1の質量分析計に送られる。第1の質量分析計で上記のイオンから特定の前駆イオンが選択され、第2の質量分析計へと送られる。この前駆イオンは、アルゴンガス等を照射されることでさらに小さいプロダクトイオンに断片化され、第2の質量分析計で検出され

る。このように、選択されたペプチドイオンに対して、それを断片化したプロダクトイオンの質量スペクトル(MS/MSスペクトル)が得られる。また、同時に、プロダクトイオンに断片化される前のペプチド鎖に対するMSスペクトルデータも得られる。

このようにして得られたMSスペクトルデータ及びMS/MSスペクトルデータは、コンピュータに保存され、以下のようなデータ処理によって試料に含まれているタンパク質が同定され、さらに2つの試料に含まれているタンパク質の相対比も求められる。

[0018] まず、MSスペクトルデータから、各ペプチド鎖について、試料A由来のものと、試料B由来のものとの量比を求めることができる。つまり、MSスペクトルの一つのペプチド鎖のピーク(試料A由来のもの)と、そのピークと3質量差離れた場所に現れるピーク(試料B由来のもの)と、を比較することによって、試料Aに含まれていたあるペプチド鎖の量と、試料Bに含まれていたそのペプチド鎖の量との相対比が求まることになる。

ただし、天然の元素の多くは、各元素に固有の安定同位体が存在する。このため、ある化合物の分子量も、その化合物を構成する各元素が、どの質量数の同位体をどのくらい含んでいるかによって、幾つかのピークが存在することになる。それぞれのピークの比は、化合物を構成する元素の同位体の天然の存在比から求めることが可能である。そこで、上記のようにして同定したタンパク質の試料Aと、試料Bとの定量比を比較するときには、この天然に存在する同位体ピークの分を考慮に入れ、天然の安定同位体によるピークの部分を引いておく必要がある。

[0019] 図2がその説明図である。図2(a)に示すように、MSスペクトルにおいて一つのペプチドのピークに(符号210a)は、それぞれ天然に存在する同位体のピーク(符号210b、210c、210d、210e、...)が付随する。図2(a)では、それらのピークの内、最も質量数が低いものを実線で、他のものを点線で示した。

[0020] 一方、2種類のタンパク質試料A、Bをそれぞれ異なる質量数を持つ標識化合物O-メチルイソウレアで修飾したため、混合試料のMSスペクトルにおいて、軽い標識化合物で同位体標識したペプチドのピーク(符号210a)に対応して、質量数3だけ離れた位置に、重い標識化合物で同位体標識したペプチドのピーク(符号220)が現れることになる。そのため、軽い標識化合物でラベル化したペプチド鎖に付随する天然に

存在する同位体のピークの一つ(図2(b)の符号210d)と、重い標識化合物でラベル化したペプチドのピーク(符号220)とが重なってしまう。そこで、符号220のピークから、符号210dのピークを差し引いて得たピーク高さ(符号240)と、符号210aのピーク高さ(符号230)とを比較することで、それぞれのピークで表されたペプチド鎖の量比が決定される。

ここでは、ピークの内最も質量数の小さいピークを基準として用いた場合を示したが、他の部分、例えば、ピーク高さが最も高いピークを基準として用いてもよい。また、もちろんピーク面積によって解析を行ってもよい。

[0021] 次に、MS/MSスペクトルからは、各ペプチド鎖のアミノ酸配列が決定される。ここで、どのペプチド鎖に対してアミノ酸配列の特定を行うかは、上記のMSスペクトルによる情報をもとにして選択することができる。この選択は、解析の目的に応じて行えばよい。例えば、試料Aと試料Bとの間で異なる部分のみを解析したい場合、試料Aと試料Bとで含有量が異なるペプチド鎖に対してのみ解析を行えばよい。もちろん、同量のものについて解析を行っても、また、すべてのペプチド鎖に対して解析を行ってもよい。このように、どのペプチドを解析するかを選択できるため、効率よく試料の解析を行うことができる。

以上のようにしてペプチド鎖のアミノ酸配列が決定されれば、既知のDNA配列を記録した公知のデータベース検索ソフト(例えば、Mascot(Matrix Science社製)等)によって、そのアミノ酸配列と、既知タンパク質の遺伝子情報とが比較され、目的とするペプチド鎖に対応するタンパク質が同定できる。

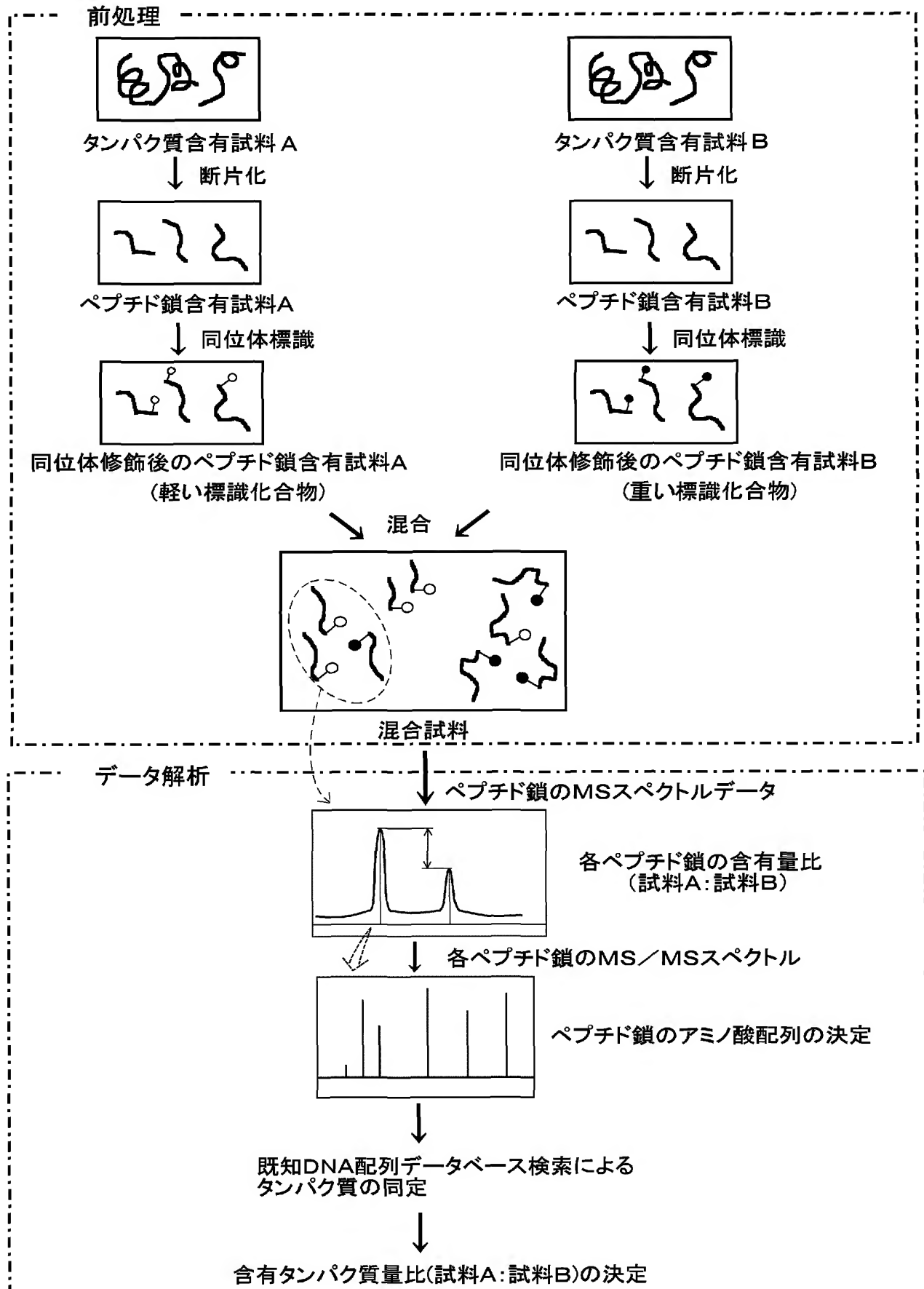
[0022] 各ペプチド鎖に対する試料A、試料Bにおける含有量の比は、上記のようにMSスペクトルから求められているため、タンパク質自身の含有量の比もそのタンパク質に対応するペプチド鎖の含有量の比として求まることとなる。

このように本実施形態のタンパク質解析方法によれば、MS/MSスペクトルから両方の試料A、B中に含まれていたタンパク質を同定すると同時に、MSスペクトルからその相対量を決定することができる。

請求の範囲

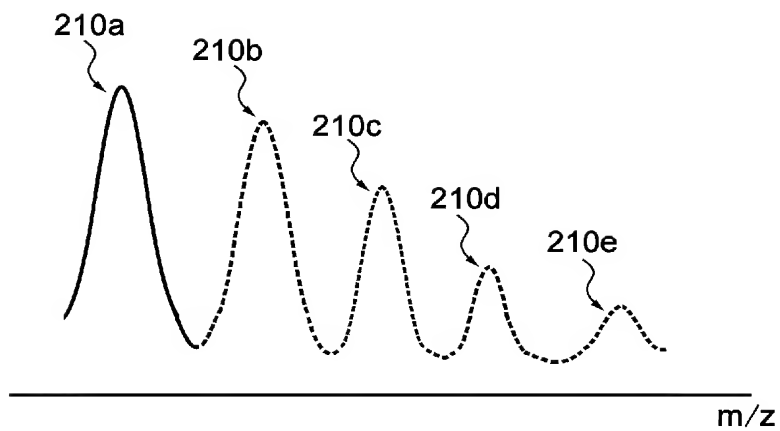
- [1] 質量分析計を用い、2種のタンパク質含有試料を対比して、それぞれの試料に含まれるタンパク質の同定及びそれぞれの試料に含まれる同種のタンパク質の量比を解析するタンパク質解析方法において、
- 前記2種のタンパク質含有試料をそれぞれ制限酵素により特定アミノ酸部位で切断し、ペプチド鎖含有試料とする工程と、
- 同位体により異なる質量差を有する標識化合物を前記それぞれのペプチド鎖含有試料に含まれるペプチド鎖に修飾し、それぞれのペプチド鎖含有試料に含まれる同種のペプチド鎖に質量差を与える工程と、
- 各同位体標識したペプチド鎖含有試料を混合し、該混合試料を各ペプチド鎖毎に分別定量してMSスペクトルを測定し、同位体標識によって質量差を与えられた同種のペプチド鎖について含有量比を求める工程と、
- 前記MSスペクトルを参照して、各ペプチド鎖からアミノ酸配列を特定すべきペプチド鎖を選択し、該ペプチド鎖から生成されるプロダクトイオンの質量スペクトルによって、該ペプチド鎖のアミノ酸配列を定性する工程と、
- 前記ペプチド鎖のアミノ酸配列に基づき、既知DNA配列より対応するタンパク質を特定する工程と、
- 前記同位体修飾したペプチド鎖の質量差による分別定量値に基づいて、前記特定したタンパク質の前記各タンパク質含有試料に含まれる含有量の比を求める工程と、を含むことを特徴とするタンパク質解析方法。
- [2] 請求項1に記載のタンパク質解析方法において、
- 前記標識化合物としてO-メチルイソウレアとその安定同位体を用いたことを特徴とするタンパク質解析方法。
- [3] 請求項2に記載のタンパク質解析方法において、
- 前記同種のペプチド鎖の含有量比を求める工程で、前記修飾化合物によって質量差を与えられた同種のペプチド鎖の2つのMSスペクトルのピークを比較する際に、天然に存在する同位体元素によるペプチド鎖の同位体ピークとの重なりを除去して定量比の補正をすることを特徴とするタンパク質解析方法。

[図1]

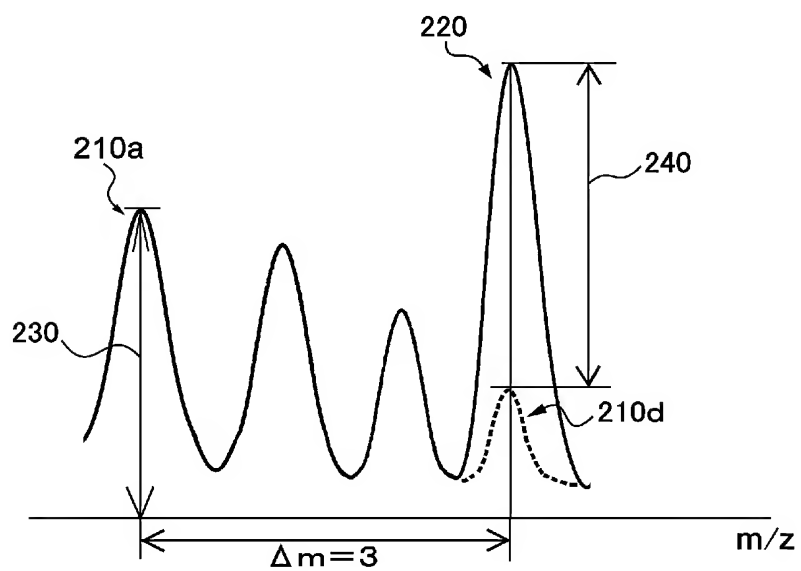


[図2]

(a)



(b)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018923

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N27/62, G01N33/68, C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N27/62-27/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	J.Ji et al., "Strategy for qualitative and quantitative analysis in proteomics based on signature peptides", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B, Vol.745, No.1, 04 August, 2000 (04.08.00), pages 197 to 210	1 2-3
Y	WO 03/098182 A2 (PROTEOSYS AG.), 27 November, 2003 (27.11.03), Description, page 21, Par. No. [0001] & DE 10315932 A1	2-3
Y	WO 02/052271 A2 (NOVARTIS AG.), 04 July, 2002 (04.07.02), Description, page 25, line 31 to page 26, line 2 & JP 2004-516486 A & CA 2432052 A1	3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 January, 2005 (06.01.05)

Date of mailing of the international search report

25 January, 2005 (25.01.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018923

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-514302 A (GEORGE WASHINGTON UNIVERSITY, School of Medicine and Health Sciences), 14 May, 2002 (14.05.02), Description, page 16 & WO 98/42006 A1 & CA 2283177 A1 & AU 745912 B2	3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ G01N27/62, G01N33/68, C12Q 1/37		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ G01N27/62-27/70		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2005年 日本国登録実用新案公報 1994-2005年 日本国実用新案登録公報 1996-2005年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
JICSTファイル(JOIS), CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	J. Ji, <i>et al.</i> : "Strategy for qualitative and quantitative analysis in proteomics based on signature peptides" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B, Vol. 745, No. 1, 2000.08.04 pp. 197-210	1 2-3
Y	WO 03/098182 A2 (PROTEOSYS AG) 2003.11.27 明細書第21頁第1段落 & DE 10315932 A1	2-3
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	06.01.2005	国際調査報告の発送日 25.1.2005
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員) 高場 正光	2W 2910
日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番号 03-3581-1101 内線 3290	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 02/052271 A2 (NOVARTIS AG) 2002.07.04 明細書第25頁第31行－第26頁第 2 行 & JP 2004-516486 A & CA 2432052 A1	3
A	JP 2002-514302 A (ジョージワシントン大学 医学、健康科学部) 2002.05.14, 明細書第16頁 & WO 98/42006 A1 & CA 2283177 A1 & AU 745912 B2	3